THESIS

MUNICH

1967

DIE ROLLE DER LUNGE BEI HÄMATOGENER TUMORZELLAUSSAAT

(TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN)

Franz Kellerer

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153723_0044

AUS DER I. FRAUENKLINIK UND HEBAMMENSCHULE
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. W. Bickenbach

DIE ROLLE DER LUNGE BEI HÄMATOGENER TUMORZELLAUSSAAT

(TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Franz Kellerer

aus Waischenfeld

München 1967

G. Bauknecht, Dissertations-Druckerei, 8 München 8, Zeppelinstr. 79, Tel. 458195

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. H.-J. SOOST
Mitberichterstatter: Professor Dr. med. W. BICKENBACH
Dekan: Professor Dr. M. KIESE

Tag der mündlichen Prüfung: 24.1.1967

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

EINLEITUNG 5

1. Metastasierung von bösartigen Tumoren
2. Nachweis von Tumorzellen im Blut durch Untersuchungen am Menschen und im Tierexperiment

DIE FRAGESTELLUNG 6

MATERIAL UND METHODE 6

1. Tiermaterial
   Art, Gewicht und Ernährung
2. Der Tumor
   a) Erzeugung durch Yoshida
   b) Übertragung des Sarkoms
   c) Morphologie des Aszites
3. Technik der Zellmarkierung
   a) Versuche mit Vitalfarbstoffen
   b) Entwickeltes Verfahren mit Acridinorange
4. Verfahren
   a) Färbung der Zellen in vitro
   b) Testung der Vitalität
   c) Überprüfung des Zellgehaltes der Farbstofflösung
   d) Narkose und Injektion
   e) Weiterverarbeitung der Versuchstiere
   f) Gefrierschnitt und Mikroskopie

ERGEBNISSE 11

1. Allgemeine Beobachtungen
2. Die Ergebnisse im einzelnen
   a) Nachweis der Tumorzellen in der Lunge
   b) Ausscheidung durch die Alveolen wurde nicht beobachtet
   c) Die Zellen passieren die Lunge
   d) Die Lungenfärbung in Leerversuchen

3. Die Einzelversuche

Tabelle I : Versuch 1 - 30
Tabelle II: Versuch 31 - 62
Erläuterungen zu den Tabellen

4. Bemerkenswerte Einzelbeobachtungen

DISKUSSION DER ERGEBNISSE 20

PHOTOGRAPHIEN 21

ZUSAMMENFASSUNG 23

LITERATURVERZEICHNIS 24

DIE ROLLE DER LUNGE BEI HÄMATOGENER TUMORZELLAUSSAAT

Eines der Merkmale des malignen Tumors ist die Metastasenbildung (6, 18). Es können sich entartete Zellen aus dem Verband des Tumorgewebes lösen und auf dem Blut- oder Lymphweg verschleppt werden. Am Ort, an dem sie sich festsetzen, bilden sie dann, wenn gewisse Voraussetzungen erfüllt sind, eine neue Geschwulst.

Der Übertritt von Tumorzellen in die Blutbahn und ihr weiteres Schicksal gibt seit langem Anlaß zu zahlreichen Untersuchungen. Dabei zeigt sich, daß sich Karzinome und Sarkome verschiedener Struktur und Lokalisation in ihrem Metastasenmuster sehr unterscheiden (6, 31). Außerdem weisen die einzelnen Organe keine einheitliche Bereitschaft auf, neue Geschwülste entstehen zu lassen. Es lassen sich gewisse Gesetzmäßigkeiten beobachten. Eine besteht darin, daß häufig das Organ zuerst befallen wird, welches durch das Blutgefäßsystem mit dem Primärtumor in unmittelbarem Zusammenhang steht. Davon abweichend bevorzugen die Tochtergeschwülste mancher Tumoren (z.B. Mamma, Prostata, Struma) ganz bestimmte Organsysteme, die kreislaufmäßig nicht in direktem Zusammenhang mit dem Ausgangsort stehen.

Für die Medizin warf die Metastasenbildung bösartiger Geschwülste viele Fragen auf. Zahlreiche Wissenschaftler beschäftigten sich mit Einzelfragen, wie beispielsweise der Lokalisation der Sekundärgeschwülste (5, 6, 28, 40).

Von besonderem Interesse war auch das Aufsuchen von Tumorzellen und deren Verhalten im strömenden Blut. POOL und DUNLOP (23), ENGELL, ROBERTS und Mitarbeiter (24), MOORE (20) und SANDBERG (26), in Deutschland vor allem SOOST (34-38), HERMANN (11-13) und GASTPAR (9), stellten Untersuchungen mit dem Blut erkrankter Menschen an. Im Tierexperiment, in dem man mit künstlich übertragenen Tumoren arbeiten konnte, untersuchten SOOST (34-38), MARQUARDT (19), KÖHNE (15), OTTE (22), GASTPAR (9), HERMANN (11-13) und ROBERTS (24) Blut und Organe. Ihre Ergebnisse ließen auch Folgerungen auf die menschliche Pathologie zu.

Die erste systematische Forschung überhaupt auf diesem Gebiet wurde um die Jahrhundertwende von ASWORTH (1) und ASCHOFF mit Leichenblut betrieben. In neuerer Zeit beschäftigte sich KRÜCKENMEYER (16) hiermit.

Sämtliche Untersuchungen setzten die Entwicklung komplizierter Anreicherungsmethoden (35) und spezielle Erfahrungen in der morphologischen Diagnostik voraus (15, 19, 20, 23, 27, 26). In den Ergebnissen stellte sich heraus, daß die Anzahl der gefundenen Tumorzellen abhängig war von den Strömungs-

verhältnissen, von der Tumorart, von der Lokalisation des Tumors, von mechanischen Faktoren (Massage, Operation) und - im Tierexperiment - der Zeit der Überimpfung (19, 22).

DIE FRAGESTELLUNG

Mir war die Aufgabe gestellt, zu klären

1. wie sind intravenös injizierte Tumorzellen in der Lunge lokalisiert?
2. In welcher Zahl befinden sie sich dort nach verschiedenen Zeiten?
3. Werden sie durch die Alveolen ausgeschieden?

MATERIAL UND METHODE

1. TIERMATERIAL

Ich führte unsere Versuche an Albinoratten aus. Insgesamt benötigte ich zur Tumorzüchtung, zur Testung der Virulenz der markierten Zellen, für die histologischen Untersuchungen und zur Herstellung photographischer Aufnahmen 225 Tiere. Es handelte sich um Inzuchtstämme, die in Kunststoffkäfigen aufgezogen wurden. Das Gewicht variierte zwischen 200 g und 430 g, doch wog die Mehrzahl 280 g ± 30 g. Meist handelte es sich um weibliche Tiere, doch hatten wir das Geschlecht nicht zu berücksichtigen. Die Ernährung erfolgte ausschließlich mit Trockenfutter. Zur Weiterzucht des Tumors waren die Ratten in Käfigen zu Gruppen bis fünf Stück zusammengefaßt (10).

2. TUMOR

Unsere Versuche führten wir mit dem Yoshida-Aszitessarkom durch.

Dieser Impftumor wurde von dem Japaner Yoshida 1943 künstlich erzeugt. Yoshida fütterte 30 Albinoratten drei Monate lang mit 4'Amino-2,3'-dimethylazobenzol und bepinselte dann weitere drei Monate wöchentlich dreimal die Rückenhaut mit Kaliumarsenit, worauf bei einem der Tiere ein solides Sarkom entstand. Mit einer Reproduktion der Versuchsanordnung gelang es bisher nicht, das gleiche Ergebnis zu erreichen (Lettre'17).

In der Folgezeit wurde der Tumor mechanisch zerkleinert und dann neuerdings injiziert. Dabei konnte man zwei Wege beschreiten:

a) Subkutane Injektion führte erneut zu einem soliden Tumor.

b) Intraperitoneale Überimpfung dagegen erzeugte eine Aszitesform.

Letztere verwendeten wir für unsere Untersuchungen. Die Tumorzellen setzen sich im Mesenterium fest, wuchern dort und schilfern in die freie Bauchhöhle ab, wobei sie einen milchigen Aszites bilden. Die Angangsrate beträgt 80-91 %, je nach dem verwendeten Rattenstamm, da eine Konstitution vorzuliegen scheint (15, 17). Auch Spontanrückbildungen werden beobachtet. Der Aszites enthält vorwiegend einzeln liegende Zellen (0,5-1 Million/mm^3). Diese haben einen Durchmesser von 17-25 µ (von einzelnen Autoren wird noch mehr angegeben, 8, 31). Der Kern ist ei- oder nierenförmig, die Chromatinstruktur aufgelockert. Im Kern sind große Nukleolen enthalten. Eine Zellteilung erstreckt sich jeweils über 8-9 Stunden. Bei intraperitonealer Applikation genügt u.U. eine einzige Zelle, um einen neuen Tumor entstehen zu lassen (17, 21, 29).

3. TECHNIK

Unsere Aufgabe war es zunächst, eine Methode auszuarbeiten, mit der lebend markierte Tumorzellen im fixierten histologischen Schnitt nachgewiesen werden konnten.

a) Versuche mit Vitalfarbstoffen

Dieses Ziel versuchten wir mit Vitalfarbstoffen nach Angaben von ROMEIS (25) zu erreichen. Der Weg erwies sich aber als nicht gangbar, denn die angegebenen Farbstoffe, Neutralrot und Trypanblau, die wir in unterschiedlicher Konzentration erprobten (0,1 - 1,0 %), ließen keine so intensive Färbung erzielen, daß die in vitro markierten Zellen unter dem Mikroskop auch später wieder hätten aufgefunden werden können. War die Färbung kräftig genug durchgeführt worden, so hatten die Zellen erheblich an Virulenz eingebüßt bzw. diese ganz verloren. Diese Vitalfarbstoffe kamen also für uns nicht in Frage, weil wir das Verhalten noch lebensfähiger Zellen zu untersuchen hatten.

b) Versuche mit Acridinorange

Versuche mit Acridinorgange erwiesen sich dagegen für unsere Zwecke als brauchbar. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wird von F. BERTALANFFY zur speziellen zytologischen Tumordiagnostik angegeben (2, 3, 4). Für uns war es jedoch nicht von Bedeutung, Tumorzellen selektiv zu färben. Vielmehr wollten wir die Zellen des Aszites, der fast ausschließlich solche abgeschilferte Elemente enthält, markieren, um sie nachher im Gewebsschnitt wieder aufzufinden. Wichtig aber war ein für die Zellen schonendes Verfahren, um sie durch die Behandlung nicht abzutöten.

BERTALANFFY hatte eine Methode zur speziellen Färbung von Tumorzellen entwickelt. Dabei machte er sich die besondere Affinität des Farbstoffes zu der vermehrt enthaltenen Ribonukleinsäure zunutze. Es fluoreszieren bei genauer Einhaltung von pH 5 normale Zellen im ultravioletten Licht grün, Tumorzellen dagegen orange bis rot. Chemisch ist Acridinorange 3.6-Tetramethyldiaminoacridin (2, 3, 41, 42, 44). SCHULTIS, MAGGI und BIKFALVI (32) verwendeten diese Substanz, um Krebszellen im Leichenblut aufzusuchen, was bisher nach den morphologischen Kriterien der Cytodiagnostik geschehen war. WITTEKIND (44) suchte nach besonderen Merkmalen in der noch lebenden Tumorzelle nach Färbung mit Acridinorange, wobei ihm die Speicherung in besonderen Vakuolen auffiel. STRUGGER (39) nahm damit Vitalfärbungen an Hefezellen, Bakterien, Fröschen und Mäusen vor und stellte die geringe Toxizität fest.

Da für uns die selektive Färbung ohne Bedeutung war, konnten wir auch auf das Einhalten von pH 5 verzichten. Außerdem durften wir mit Formalin fixieren, das die hochmolekulare Ribonucleinsäure depolymerisiert und damit die charakteristische Orange- bzw. Rotfärbung stört (SCHÜMMELFELDER, 33).

4. VERFAHREN

a) Färbung in vitro

Bei den erfolgreich überimpften Tieren zeigte sich nach durchschnittlich vierzehn Tagen ein deutlicher Aszites. Wir entnahmen von diesem einige ml unter aseptischen Bedingungen, in Narkose oder nach Tötung, mittels einer Injektionsspritze und gaben hiervon je nach Zellgehalt 1 bis 3 ml in 10 ml 0,1 % Acridinorangelösung. Bei den anfänglichen Versuchen wuschen wir die Tumorzellen im Anschluß an die Färbung und nach Zentrifugieren mit physiologischer Kochsalzlösung aus. Doch erwies sich das Auswaschen einerseits als technisch nicht einwandfrei durchführbar (es gingen viele Zellen verloren; außerdem dauerte es relativ lange, bis wir die Suspension injizieren konnten, was eine weitere Schädigungsmöglichkeit für die Zellen darstellte). Andererseits zeigte es sich, daß es vorteilhaft war, die Farbstofflösung mit zu injizieren, weil dadurch auch die Gewebe eine gewisse Färbung erfuhren und so unter dem Fluoreszenzmikroskop differenziert werden konnten.

Im Laufe der Versuche stellten wir fest, daß mit 0,75 ml einer 0,1 %igen Lösung die Gewebe eine günstige Färbung erfuhren, die markierten Zellen sich aber noch sehr gut abhoben. Wir wählten daraufhin von Versuch 31 an den Zellgehalt der zu injizierenden Suspension so, daß wir jeweils in 0,75 ml die gewünschte Menge hatten. Das war bei einer Konzentration von 50 000 bis

120 000/mm^3 der Fall. Die Injektion nahmen wir 10 Minuten. nachdem wir den Aszites in die Lösung gebracht hatten, vor. Analog injizierten wir in Leerversuchen 0,75 ml Acridinorangelösung, die wir durch Verdünnung von 10 ml 0,1 %iger Lösung mit 3 ml (entsprechend der gebräuchlichen Aszitesmenge) physiologischer Kochsalzlösung hergestellt hatten.

Die Leerversuche waren erforderlich, um sicher zu sein, daß wir keine Lungenstrukturen, die etwa selektiv den Farbstoff speicherten, fälschlich für markierte Tumorzellen hielten.

b) Testung der Vitalität

Um zu verhindern, daß wir in unseren Versuchen abgestorbene Tumorzellen den Ratten verabreichten, die sich unter Umständen anders als lebensfähige verhalten konnten, testeten wir die markierten Zellen. Hierzu überimpften wir sie nach 10 bis 15-minütiger Färbung auf gesunde Ratten. Die gleiche Dauer wandten wir in den Versuchen an. Die Angangsrate von 80 % zeigte, daß die Einbuße an Virulenz zumindest nicht erheblich sein konnte.

c) Überprüfung des Zellgehaltes

Um bei den einzelnen Versuchen eine möglichst konstante Zellzahl zu verabreichen, war es erforderlich, ihren Gehalt in der Farbstofflösung zu überprüfen. Wir verdünnten hierzu die angesetzte Suspension mit einer Erythrocytenpipette auf 1:100 mit physiologischer Kochsalzlösung und brachten sie in eine Neubauer-Zählkammer, zählten unter dem Fluoreszenzmikroskop jeweils 10 Gesichtsfelder mit 125-facher Vergrößerung (Objektiv 10x, Okular 12,5x) aus, errechneten das arithmetische Mittel und bekamen nach der folgenden Überlegung die Zellzahl/mm^3.

Radius des Gesichtsfeldes: 0,20 mm
Fläche des Gesichtsfeldes: $0,04 \times 3,1415 = 0,12567\ mm^2$
Volumen (bei 0,1 mm Höhe):
$0,0125\ mm^3 = 1/80\ mm^3$
Verdünnung 1:100 Volumen mal Verdünnung = 1/8000

Die gefundenen Zellen mit dem Faktor 8000 multipliziert ergaben also die Zahl, die in einem mm^3 enthalten war.

d) Narkose und Injektion

Nachdem wir auf Grund dieser Überlegungen in eine neue Farbstofflösung die errechnete Menge Aszites gebracht hatten, verabreichten wir nach der oben beschriebenen Färbung 0,75 ml der Suspension in die Jugularvene der inzwischen vorbereiteten Versuchstiere.

Die Ratten wurden zunächst mit einer 0,5 % Pentothallösung narkotisiert. Je nach Gewicht reichten intraperitoneal 2,5 - 3,5 ml aus. Der leichteren Verabreichung wegen wurde die Betäubung mit Äther eingeleitet. Dann entfernten wir das Halsfell und legten die Jugularvene frei. Die Injektion nahmen wir mit einer Kanüle Nr. 20 vor. Die gewählte Vene erwies sich insofern als günstig, weil wir in sie wegen ihrer Größe relativ leicht eingehen konnten, besonders aber, weil wir eine Augenkontrolle hatten. Bei perkutanen Versuchen an der Schwanzvene hatten wir nämlich die Beobachtung gemacht, daß diese leicht unbemerkt zerreißen konnte, die Injektionsflüssigkeit nicht in den Kreislauf gelangte und damit der Versuch nicht auswertbar war. Den erforderlichen operativen Eingriff überstanden unsere Ratten bis zur Tötung nach 5 oder 30 (in den Anfangsversuchen bis zu 60) Minuten ausnahmslos.

e) Weiterverarbeitung der Versuchstiere

Nach der beabsichtigten Zeit wurden die Tiere durch Eröffnung der Arteria subclavia entblutet. Anschließend wurden die Lunge und weitere Organe entnommen. Die Trachea banden wir bei diesem Vorgehen jeweils ab, um zu verhindern, daß auf dem Respirationsweg tumorzellhaltiges Blut in die Bronchien und weiter in die Alveolen gelangen konnte. Sofort wurden die entnommenen Organe durchschnittlich 24 Stunden lang in 5 % Formalin fixiert. Teilweise fertigten wir auch noch nach 48-stündiger Fixierung Schnitte an, um die Beobachtungen vom Vortage zu überprüfen.

f) Gefrierschnitte und Mikroskopie

Nach der Fixierung entnahmen wir der Lunge Gewebsproben. Vergleiche zwischen apikalen, basalen und zentralen Lappenanteilen ergaben dabei keine wesentlichen Unterschiede. Lediglich in der Verteilung zeigten sich geringfügige Abweichungen. Sie war in zentralen Gewebsabschnitten etwas gleichmäßiger. Die Schichtdicke betrug durchweg 20 µ. Die Präparate brachten wir dann auf normale Objektträger und deckten sie ein. Wir werteten die histologischen Schnitte sofort aus, weil sie innerhalb weniger Minuten austrockneten und die Fluoreszenz verloren. Dazu benutzten wir die Einrichtung von Zeiss. Als Lichtquelle diente ein Osram-Quecksilber-Höchstdruckbrenner HBO 200 mit einer Leistungsaufnahme von 200 Watt. In den Strahlengang des durchfallenden Lich-

tes waren vor das Objektiv zwei Blaufilter (UG 2 und UG 5) eingebracht, so daß wir mit einem Licht der Wellenlänge 4000 - 5500 Å arbeiteten. Vor das Okular waren noch zwei Sperrfilter für Blau mit einem steilen Abfall der Durchlässigkeit im kurzwelligen Bereich eingeschaltet. Zur groben Orientierung verwendeten wir die Lupenvergrößerung (Objektiv 2,5x, Okular 12,5x) und zur eigentlichen Auswertung das Objektiv mit 10-facher Vergrößerung (insgesamt 125x). Wenn sich die genauere Klärung der Lokalisation von Einzelzellen als notwendig erwies, gingen wir auf Objektiv 25x über.

ERGEBNISSE

1. ALLGEMEINE BEOBACHTUNGEN

Insgesamt wurden bei 62 Ratten Zellen des Yoshida-Aszitessarkoms intravenös verabreicht und anschließend deren Lunge histologisch untersucht.

Für das Ergebnis waren die einzelnen Versuche von unterschiedlichem Wert. Bei den ersten 36 Tieren stellten wir Beobachtungen mehr allgemeiner Art an. Wir achteten auf Verteilung, Lokalisation und eventuelle Ausscheidung der Zellen. Vom Versuch 37 an ermittelten wir auch Zahlenwerte. Bei der Auszählung bezogen wir uns, ähnlich wie bei der Zählkammer, auf das Gesichtsfeld, was bei 125-facher Vergrößerung einer Fläche von 0,125 mm^2 entsprach.

Während wir bei den Versuchen 1-24 mit der Menge der injizierten Farbstofflösung samt Tumorzellen in ziemlich weiten Grenzen variierten (zwischen 0,20 und 1,50 ml), behielten wir sie in allen weiteren Versuchen mit 0,75 ml bei. Ebenfalls wechselten wir bis dahin den Zellgehalt/mm^3 und die Überlebenszeit (3 Minuten bis 1 Stunde). Später legten wir den Zellgehalt auf 50 000 - 120 000/mm^3 fest und ließen ein Tier 5 Minuten und ein weiteres 30 Minuten überleben. Zu einer Versuchsanordnung gehörten also jeweils zwei Ratten.

2. DIE ERGEBNISSE IM EINZELNEN

a) Nachweis der Tumorzellen

Die Tumorzellen konnten im histologischen Schnitt nachgewiesen werden. Dabei ergab sich bezüglich der Lokalisation und Zahl der aufgefundenen Zellen eine gesetzmäßige Abhängigkeit von der Zeit, welche die Ratten nach erfolgter Injektion noch lebten.

aa) Überlebenszeit von 5 Minuten

Es befanden sich viele Tumorzellen im Lungengewebe. Die Verteilung war ziemlich gleichmäßig im ganzen Schnitt. In den großen Blutgefäßen um

die Bronchien waren sie stark angereichert und lagen teilweise auch in größeren Gruppen beisammen.

bb) Überlebenszeit von 30 Minuten

Die Zahl der Tumorzellen insgesamt war stark abgefallen. Sie wiesen nicht mehr die gleichmäßige Verteilung auf. Größere Gefäße waren nach der längeren Zeit ganz frei. Zellen befanden sich ausschließlich im Bereich der kleinsten Gefäße. Eine leichte Anhäufung war entlang der Pleura zu beobachten.

b) Ausscheidung durch die Alveolen

Weder frei in den Alveolen noch in den Bronchiallichtungen waren Tumorzellen nachzuweisen. Ganz vereinzelte Zellen (eine oder zwei im ganzen Schnitt) wurden möglicherweise beim Schneiden oder Aufziehen auf die Objektträger dorthin verschleppt. Besonders bei einer Überlebenszeit von 30 Minuten waren einzelne Zellen leistenförmig in die Bronchiallichtung vorgeschoben. Bei der Musterung mit stärkerer Vergrößerung (25 x 12,5) stellte sich jedoch heraus, daß sie in kleinsten Septen steckengeblieben waren und zumindest noch durch eine zarte Membran vom Lumen getrennt waren. Ein Übertritt in das Stroma aus den Gefäßen konnte mit der Fluoreszenzmethode nicht ausgeschlossen werden (Abbildungen). Eine Ausscheidung wurde jedenfalls im Verlauf der ersten 30 Minuten nicht festgestellt.

c) Die Zellen passieren die Lunge

Die Tumorzellen blieben nicht in der Lunge liegen, sondern passierten sie zu einem großen Teil. Sie gelangten damit in den Körperkreislauf. Untersuchungen von AUBAUER zeigten, daß sie in anderen Organen aufzufinden waren, und zwar in umso größerer Zahl, je mehr Zeit seit der Applikation verstrichen war.

d) Die Lungenfärbung in Leerversuchen

In Leerversuchen wurde die Lungenstruktur gut angefärbt. Wir verwendeten hierzu reine Acridinorangelösung. Es zeigten sich keine fluoreszierenden Partikel, die zu Verwechslungen mit den markierten Tumorzellen hätten Anlaß geben können. Die Lunge war nach 5 Minuten und 30 Minuten gleich gut differenzierbar, jedoch deutlich weniger als sonst die markierten Zellen.

3. DIE EINZELVERSUCHE

Versuchs-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Injizierte Menge	0,50	1,00	0,50	0,50	1,50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,50	1,50	1,50	0,10	0,25	0,05
Konzentration ($x10^3$)	$>10^3$	$>10^3$	$>2x10^3$	10^3	400	320	320	80	800	800	640	800	80	16	16
Überlebenszeit	15	15	30	15	30	15	30	30	45	20	50	15	35	30	10
Zellzahl															
a) selten				/									a	a	a
b) vereinzelt	b					b		b							
c) zahlreich		c					c				c	c			
d) überschwemmt			d		d				d	d					
Verteilung															
a) gleichmäßig	a		a	/	a	a			a	a					a
b) ungleichmäßig		b					b	b			b	b	b	b	
Große Gefäße				/											
a) leer												a	a	a	
b) wenige Zellen					b						b				b
c) viele Zellen		c	c						c	c					
d) Zellhaufen	d					d	d	d							
Lichtungen				/											
a) frei	a	a	a		a			a	a	a	a	a	a	a	a
b) weit vorgeschoben							b								
c) einzelne Zellen						c									

TABELLE I (1 - 15)

Versuchs-Nr.	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Injizierte Menge	0,20	0,25	/	0,50	0,25	0,50	0,75	1,00	1,00	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Konzentration ($x10^3$)	160	46	46	200	200	160	160	80	80	720	720	720	720	240	240
Überlebenszeit	25	15	/	15	20	30	25	15	5	15	60	15	60	60	30
Zellzahl															
a) selten			/			a									
b) vereinzelt	b	b		b				b	b					b	b
c) zahlreich					c		c				c		c		
d) überschwemmt										d		d			
Verteilung															
a) gleichmäßig	a		/				a		a	a					
b) ungleichmäßig		b		b	b	b		b			b	b	b	b	b
Große Gefäße															
a) leer	a		/			a		a			a		/		a
b) wenige Zellen		b		b					b	b		b		b	
c) viele Zellen					c		c								
d) Zellhaufen															
Lichtungen															
a) frei	a		/	a		a				a	a	a	a	a	
b) weit vorgeschoben		b			b		b		b						b
c) einzelne Zellen								c							

TABELLE I (16 - 30)

Versuchs-Nr.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
Konzentration ($x10^3$)	80	80	80	80	96	96	88	88	72	72	72	72	96	96	96	96
Überlebenszeit	5	20	35	5	30	5	30	5	30	5	30	5	30	5	30	5
Verteilung a) gleichmäßig b) ungleichmäßig	a	b	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	a	b	b	a
Große Gefäße a) frei oder wenige Zellen b) viele Zellen	b	a	a	b	a	/	a	b	a	b	b	b	a	b	a	b
Zellzahl							30	120	0,75	80	0,80	35	17,50	10,70	9,75	25

TABELLE II (31 - 46)

Versuchs-Nr.	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62
Konzentration ($x10^3$)	73	73	73	73	120	120	64	64	49	49	49	49	104	104	104	104
Überlebenszeit	30	5	30	5	30	5	30	5	30	5	30	5	30	5	30	5
Verteilung a) gleichmäßig b) ungleichmäßig	b	a	b	a	b	a	b	/	b	a	a	a	b	a	b	a
Große Gefäße a) frei oder wenige Zellen b) viele Zellen	a	b	a	b	a	b	a	/	b	b	a	b	a	a	a	a
Zellzahl	4,85	6,50	7,05	7,25	5,43	30	8,66	/	2,25	12	2,77	8,50	5,70	9,60	4,60	10,8

TABELLE II (47 - 62)

ERLÄUTERUNGEN ZU DEN TABELLEN

Injizierte Menge	wurde jeweils in ml angegeben
Konzentration	die angegebene Zahl mit dem Faktor 1000 multipliziert ergab die Zellzahl, die ein ml der injizierten Farbstofflösung enthielt
Überlebenszeit	wurde in Minuten angegeben
Zellzahl	
a) selten:	durchschnittlich bis zu zwei Zellen in einem Gesichtsfeld = 0,125 mm^2; vielfach auch keine Zelle
b) vereinzelt:	zwei bis fünf Zellen in einem Gesichtsfeld. Bei ungleichmäßiger Verteilung ist das der Durchschnittswert
c) zahlreich:	in jedem Gesichtsfeld mindestens fünf Zellen, jedoch keinesfalls über 25
d) überschwemmt:	die kleinen Gefäße im peribronchialen Gewebe und in den Alveolarwänden mit Tumorzellen völlig ausgefüllt; Zählung war nicht mehr möglich (oft mehrere hundert)
Verteilung	
a) gleichmäßig:	es befanden sich in allen Lungenabschnitten markierte Zellen (sowohl im peribronchialen Stroma als auch in den Alveolarbezirken). Kein Gesichtsfeld war ganz frei; die Einzelzahlen variierten jedoch im Verhältnis bis zu 1 : 4
b) unregelmäßig:	im allgemeinen lagen die Tumorzellen bevorzugt in den dünnen Alveolarsepten, während das grobe Stroma um die Bronchien wenige Zellen enthielt und die größeren Gefäße meist ganz frei waren. Aber auch in den Alveolarbezirken waren oft Flächen von mehreren Gesichtsfeldern frei
Große Gefäße	
a) leer:	es waren keine Tumorzellen enthalten
b) wenige Zellen:	bis zu drei Zellen im Lumen eines Gefäßes

c) viele Zellen:	vier bis etwa 30 Zellen im Lumen eines Gefäßes
d) Zellhaufen:	neben zahlreichen Einzelzellen befanden sich in einzelnen Gefäßen Konglomerate, die aus bis zu 80 Einzelelementen bestanden

Lichtungen

a) frei:	in den Alveolen und Bronchien waren keine Tumorzellen zu finden
b) weit vorgeschobene Zellen:	sie sprangen leistenförmig in die Alveolarlichtungen vor. Bei einer Vergrößerung von Objektiv 25x, Okular 12,5x stellte sich heraus, daß sich diese nicht frei in der Lichtung befanden, sondern durch eine von der Wand ausgehende Membran noch zurückgehalten waren
c) enthaltene Zellen:	in zwei Präparaten lagen Tumorzellen in der Lichtung (1 oder 2 auf einer Fläche von ca 1 cm^2)

Bei den Versuchen 25 bis 62, wo die Injektionsmenge nicht angegeben wurde, betrug sie einheitlich 0,75 ml.

Bei Versuch 4 funktionierte das Gefriermikrotom nicht.

Bei Versuch 18 und 54 verendete die Ratte während der Injektion.

4. BEMERKENSWERTE EINZELBEOBACHTUNGEN

Die Zahl der gefundenen Tumorzellen zeigte keine genaue zahlenmäßige Relation zur Menge der injizierten Aufschwemmung. Eine sichere Erklärung konnte hierfür nicht gefunden werden. Als Ursache kommen in Frage:

a) Der Aszites enthielt manchmal mehr Zellen an der oberen Durchmessergrenze (Mittelwert näher 25 µ), manchmal mehr an der unteren Grenze (Mittelwert näher 15 µ). Infolgedessen konnten die Einzelelemente die Kapillaren verschieden schnell passieren.

b) Die Ratten reagierten auf die Injektion manchmal mit Schocksymptomen (Tachykardie, Cyanose). Dadurch dürften also die Kreislaufverhältnisse nicht völlig konstant gewesen sein.

c) Die Ratten hatten kein einheitliches Gewicht (Unterschiede zwischen 200 g und 450 g; meist lag es jedoch um 280 g). Folglich verteilten sich die verabreichten Zellen auf eine unterschiedliche Körpermasse bzw. auf verschiedene Lungengewichte.

d) Die Zahl der verabreichten Zellen war nicht ganz konstant, weil es nicht durchführbar war in der Lösung den genau gleichen Gehalt herzustellen.

Vorwiegend in den Versuchen mit 30-minütiger Überlebenszeit befanden sich - nicht ganz regelmäßig - im Gewebe entlang der Pleura durchschnittlich mehr Zellen als im übrigen Schnitt. Wir nahmen an, daß diese nicht näher untersuchte Tatsache auf die andersgearteten Verhältnisse der Pleura zurückzuführen war. Dieser Effekt war im Versuch 23 ganz besonders stark ausgeprägt, bei anderen Tieren dagegen trat er kaum in Erscheinung.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Alle bisherigen Methoden, Tumorzellen im strömenden Blut oder in Organen nachzuweisen, stützten sich auf die morphologische Diagnostik (allgemeine Kriterien der Malignität und selektive Färbung) und auf den biologischen Test durch Übertragung von Blut oder Organbrei (Tierexperiment). Auch Markierung mit radioaktiven Isotopen wurde angewandt. Besonders beim biologischen Test hatte sich gezeigt, daß in einem bestimmten Organ sehr wohl bösartige Elemente angeschwemmt sein können, ohne daß sich Metastasen zu bilden brauchen. Eine genaue Lokalisation der Zellen im mikroskopischen Bild war aber nicht erfolgt. Die Versuchsanordnungen waren ziemlich empfindlich und aufwendig.

Mit dem von uns angewandten Markierungsverfahren war dagegen die genaue Lage im Gewebe und das Verhalten der injizierten Tumorelemente eindeutig und relativ einfach zu beobachten. Die Untersuchung erfolgte am histologischen Schnitt.

Naturgemäß läßt sich unser Verfahren mit lebensfähigen Tumorzellen nur im Tierexperiment ausführen.

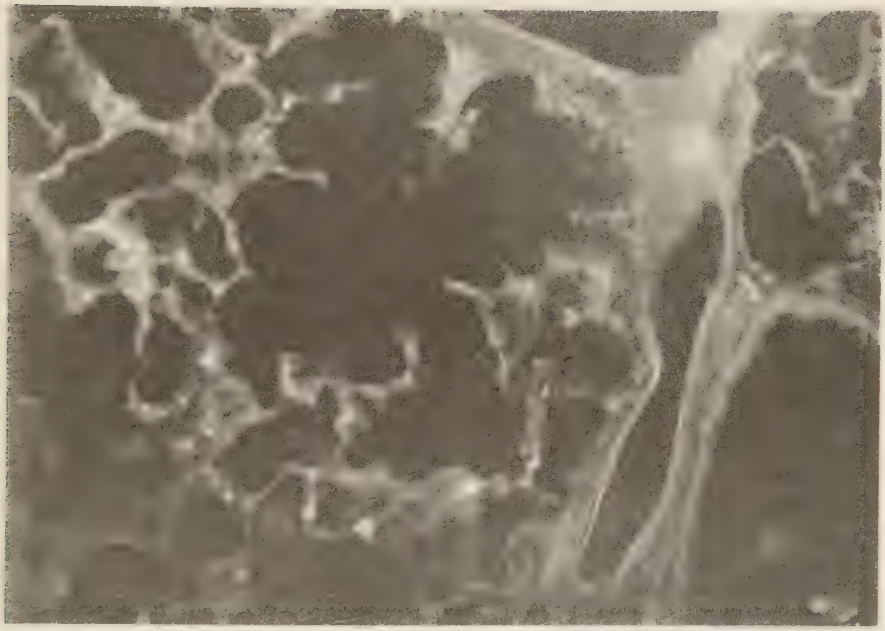

Abbildung 1: Unregelmäßig verteilte Tumorzellen in der Nähe eines großen Bronchus (links oben angeschnitten). Die Tumorzellen liegen in den Alveolarsepten. Bronchial- und Alveolarlichtungen sind frei. Vergrößerung: Obj.: 10x, Ok.: 12,5x

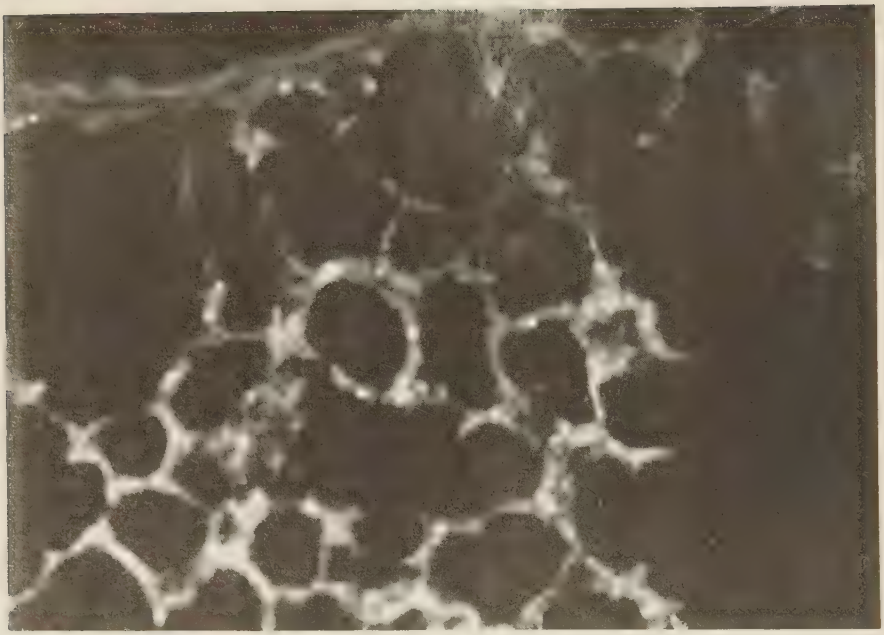

Abbildung 2: Gehäuftes Auftreten von Tumorzellen in der Nähe der Pleura (am oberen Bildrand). Sie liegen in den Alveolarsepten.
Vergrößerung: Obj.: 10x, Ok.: 12,5x

ZUSAMMENFASSUNG

Die Fragestellung war:
In welcher Zahl befinden sich intravenös verabreichte Tumorzellen nach verschiedenen Zeiten in der Lunge? Wie sind sie lokalisiert? Werden sie durch die Alveolen ausgeschieden?

Die Versuche wurden an Albinoratten ausgeführt. Die Tumorzellen stammten aus dem Yoshida-Aszitessarkom, das wir an gleichartigen Ratten durch intraperitoneale Applikation von Aszites oder Teilen solider Tumoren erzeugten.

Nach Entnahme unter aseptischen Voraussetzungen wurde der für die Versuche benötigte Aszites in einer 0,1 % Lösung des Fluoreszenzfarbstoffes Acridinorange markiert. Nach 10-minütiger Färbung der Tumorzellen erfolgte die Injektion samt Farbstofflösung in die Jugularvene von Albinoratten. 5 bzw. 30 Minuten später wurden die Tiere getötet und die entnommenen Lungen in Formalin fixiert. Am folgenden Tag untersuchten wir die mit dem Gefriermikrotom angefertigten Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Wir beobachteten die Lokalisation der Tumorzellen im Gewebe und den Gefäßen. Außerdem untersuchten wir die Alveolar- und Bronchiallichtungen auf etwa ausgeschiedene Sarkomzellen. Ab Versuch 31 ermittelten wir auch die genaue Zahl der Zellen, die sich in einem Gesichtsfeld (0,125 mm^2) befanden.

> Kurz nach der Injektion (5 Minuten) befanden sich viele Tumorzellen in relativ gleichmäßiger Verteilung in der Lunge.
> Nach 30 Minuten hatten sie weitgehend die Lunge passiert; die wenigen zurückgebliebenen Zellen waren unregelmäßig verteilt und lagen vorwiegend in den kleinsten Gefäßen. Eine Ausscheidung durch die Lunge konnte im Laufe der Untersuchungen nicht beobachtet werden.

Von den nur kurze Zeit haltbaren histologischen Präparaten wurden photographische Aufnahmen angefertigt.

LITERATURVERZEICHNIS

(1) ASHWORTH, T.R.: A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. Austral. Med. J. 14 (1896), 201

(2) BERTALANFFY, F.D.: Exfoliative Krebsdiagnose mit Akridinorange-Fluoreszenzmikroskopie. Krebsarzt 16 (1961), 521

(3) BERTALANFFY, F.D., NAGY, K.: Fluorescence Microscopy and Photomicrography with Acridine Orange. Med. Radiogr. 38 (1962), 82

(4) BERTALANFFY, L.: Acridine Orange Fluorescence in Cell Physiology, Cytochemistry and Medicine. Protoplasma 57 (1963), 51

(5) BLUMENTHAL, F.: Über die Erzeugung von Tumoren mit Blut von Tumortieren. Zschr. Krebsforsch. 29 (1929), 549

(6) BÜNGELER, W.: Die Metastasenbildung bei bösartigen Geschwülsten. Med. Welt 12 (1938), 1587
12 (1938), 1625

(7) CHONE, B., BECKER, J.: Praktische Bedeutung der peripheren Tumorzelldiagnostik. Münch. med. Wschr. 106 (1964), 33

(8) EPSTEIN, B.: Die Feinstruktur der Zellen der Aszitesflüssigkeit des Mäusesarkoms 37 Biochem. Cytolog. 3 (1957), 567

(9) GASTPAR, H., GRAEBER, F.: Der Nachweis von Tumorzellen aus dem peripheren Blut. Deutsch-Schweiz.-Österr.-Krebskongreß, 26.-29.4.1961 Salzburg Krebsforschung und Krebsbekämpfung 4 (1961), 248

(10) HAGEMANN, E.: Ratte und Maus Verlag: Walter de Gruyter u. Co, Berlin 1. Aufl. 1960

(11) HERMANN, A.: Klinischer und experimenteller Nachweis zur Erforschung der Tumorzellen im strömenden Blut. Vortrag, Tagung der Deutschen Gesellschaft der Hals-Nasen-Ohrenärzte 29. 5. -2. 6. 1960
Arch. Ohr. -Nas. -u. Kehlk. -Heilk. 176 (1960), 536

(12) HERMANN, A.: Über den gegenwärtigen Stand der Tumorzellforschung im Blut.
12. Tagung der Münchner Oto-laryngologischen Gesellschaft 9. -10. 12. 1961

(13) HERMANN, A., GASTPAR, H.: Der Nachweis von morphologischen Zellschädigungen im Blut von Tumorkranken nach cytostatischer Therapie.
Congress European Society of Haematology (1961) Wien

(14) JONESCU, P.: Über das Vorkommen von Geschwulstzellen im strömenden Blut von Tieren mit Impftumoren.
Zschr. Krebsforsch. 33 (1930/31), 264

(15) KÖHNE, E.: Nachweis intravenös injizierter Tumorzellen des Walker-Carcinosarcoms im Blut und in den Organen von Ratten.
Inauguraldiss. der Med. Fakultät d. Univ. München 1962

(16) KRÜCKENMEYER, K.: Zur cytologischen Tumorzelldiagnostik im Leichenblutgerinnsel.
Münch. med. Wschr. 106 (1964), 38

(17) LETTRE, H.: Das Yoshida-Sarkom der Ratte.
Zschr. Krebsforsch. 59 (1953), 287

(18) LIDGAS, E.: Über das Problem der hämatogenen Metastasierung beim Karzinom.
Arch. Geschwulstforsch. 4 (1952), 339

(19) MARQUARDT, H.: Experimentelle Untersuchungen über den cytologischen Nachweis von Tumorzellen im strömenden Blut und in Organen von Ratten.
Inauguraldiss. der Med. Fakultät d. Univ. München 1962

(20) MOORE, G.E., SANDBERG, A., SCHUBARG, J.R.:
Clinical and Experimental Observations of the Occurrence and Fate of Tumor Cells in the Blood Stream.
Ann. Surg. 146 (1957), 580

(21) NEISH, W.: Fate of a Rat Transplant Tumour.
Naturwissensch. 42 (1955), 420

(22) OTTE, G.: Versuche zum Nachweis von Zellen des Yoshida-Sarkoms im strömenden Blut von Ratten.
Inauguraldiss. der Med. Fakultät d. Univ. München 1962

(23) POOL, E.A., DUNLOP, G.R.:
Cancer cells in the blood stream.
Amer. J. Cancer 21 (1934), 99

(24) ROBERTS, St., WATHE, A., McGRATH, R., McGREW, E., COLLE, W.:
Technique and results of isolation of cancercells from the circulating blood.
Arch. Surg. 76 (1958), 334

(25) ROMEIS, B.: Taschenbuch der mikroskopischen Technik
Verlag: Oldenburg, München
9. Aufl. 1948

(26) SANDBERG, A., MOORE, G.E., CROSSWHITE, L.H., SCHUBARG, J.R.:
The frequency of tumor cells in the bone marrow and blood.
Cancer 11 (1958), 1180

(27) SANDBERG, A., MOORE, G.E.:
Examination of blood for tumor cells.
J. nat. Cancer Inst. 19 (1957), 1

(28) SCHICKER, H.: Untersuchungen über das Verhalten injizierter Acridinorangelösung bei Albinoratten mit Spontan- und Impftumoren.
Arch. Geschwulstforsch. 18 (1961), 289

(29) SCHLEICH, A.: Wachstum einzelner explantierter Zellen des Yoshida-Tumors.
Naturwissensch. 42 (1955), 50

(30) SCHMÄHL, D.: Tumorzellen im strömenden Blut.
Dtsch. med. Wschr. 89 (1964), 1849

(31) SCHMÄHL, D., RIESEBERG, T.:
Experimentelle Untersuchungen über die Metastasierung von Tumoren.
Zschr. Krebsforsch. 62 (1958), 456

(32) SCHULTIS, K., MAGGI, G., BIKFALVI, A.:
Zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Krebszellen im Blut.
Med. Welt 14 (1964), 746

(33) SCHÜMMELFELDER, N., EBSCHNER, K.-J.:
Die Grundlagen der differenten Fluorochromierung von Ribo- und Desoxyribonucleinsäure mit Acridinorange.
Naturwissensch. 44 (1957), 467

(34) SOOST, H.-J.: Experimentelle Untersuchungen über das Schicksal der im Blut kreisenden Tumorzellen.
Vortrag, 3. Akademische Tagung für Geburtsh. u. Gynäkologie
Geburtsh. u. Frauenheilk. 22 (1962), 1065

(35) SOOST, H.-J.: Über das Vorkommen von Tumorzellen im Blut bei bösartigen Geschwülsten des weiblichen Genitale.
Vortrag, 1. Internat. Kongress für Exfoliativ-Zytologie 31.8.1961 Wien

(36) SOOST, H.-J.: Über das Vorkommen von Tumorzellen im zirkulierenden Blut.
Dtsch. med. Wschr. 85 (1960), 893

(37) SOOST, H.-J.: Über die klinische Bedeutung des Tumorzellnachweises im Blut beim Genitalkarzinom der Frau.
Vortrag, 3. Internat. Kongress für Gynäkologie und Geburtshilfe 3.9.1961 Wien

(38) SOOST, H.-J., MAD, H.:
Methoden zur Isolierung von Geschwulstzellen aus dem strömenden Blut.
Krebsarzt 15 (1960), 275

(39) STRUGGER, S.: Die Vitalfluorochromierung des Protoplasmas. Naturwissensch. 34 (1947), 267

(40) TATENUMA, K., OKONOZI, S.: Experimentelle Untersuchungen über Metastasen bei Mäusekarzinomen. Zschr. Krebsforsch. 21 (1923), 168

(41) WELLMANN, K.: Kritische Bemerkungen zur Akridinorange-Fluorochromierung in der cytologischen Krebsdiagnostik. Med. Welt 16 (1962), 2100

(42) WELLMANN, K.: Zur Bewertung der Akridinorange-Fluorochromierung in der Cytodiagnostik des Krebses. Münch. med. Wschr. 104 (1962), 1428

(43) WITTEKIND, D.: Die Vitalfärbung des Mäuseascitescarzinoms mit Acridinorange. Zschr. Zellforsch. 49 (1958), 58

(44) WITTEKIND, D.: Über die Bedeutung der Vitalfluorochromierung für die zytologische Tumordiagnostik. Vortrag, Ärztetag der Deutschen Gesellschaft für angewandte Zytologie, München 5.-7.9.1963 Sonderband, Verlag: E.A. Mueller München

(45) WÜST, G., BIRK, G.: Über das Vorkommen von Krebszellen im strömenden Blut. Hippokrates 35 (1964), 537

Herrn Professor Dr. med. W. BICKENBACH möchte ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes an seiner Klinik danken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. H.-J. SOOST danke ich freundlichst für die Themastellung, für das Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte und für Rat und Förderung, die er mir jederzeit großzügig gewährte.

LEBENSLAUF

Am 16. Februar 1939 bin ich, Franz Kellerer, als Sohn des Praktischen Arztes Dr. med. Friedrich Kellerer und seiner Ehefrau Sabine in Waischenfeld/ Oberfranken geboren. Ich bin das vierte von fünf Kindern.

Nach dem Besuch von fünf Klassen Volksschule in meinem Geburtsort ging ich an das Neue Gymnasium in Bamberg. Dort legte ich 1959 das Abitur ab. Im Anschluß daran leistete ich meinen Wehrdienst. Im Sommersemester 1961 begann ich an der Universität München mit dem Medizinstudium. Hier bestand ich auch im Juli 1963 die ärztliche Vorprüfung. Am 14. Dezember 1966 legte ich das ärztliche Staatsexamen ab.